PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation [7]: C12P 41/00, 17/10, 13/00, 13/02, C07C 233/52 — A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 00/03032**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Januar 2000 (20.01.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04814

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juli 1999 (08.07.99)

(30) Prioritätsdaten:
98112719.4 9. Juli 1998 (09.07.98) EP
98123949.4 17. Dezember 1998 (17.12.98) EP

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: LONZA AG [CH/CH]; Münchensteinerstrasse 38, CH-4052 Basel (CH).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BERNEGGER-EGLI, Christine [CH/CH]; Bahnhofstrasse, CH-3985 Münster (CH). BRUX, Frank [CH/CH]; Haus Formes, CH-3942 Raron (CH). RODUIT, Jean, Paul [CH/CH]; Loos, CH-3979 Grône (CH). WERBITZKY, Oleg [DE/CH]; Terbinerstrasse 12, CH-3930 Visp (CH). GUGGISBERG, Yves [CH/CH]; Avenue du Rothorn 11, CH-3060 Sierre (CH).

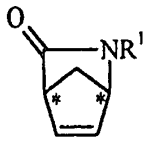
(74) Anwälte: RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl & Partner, Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising (DE).

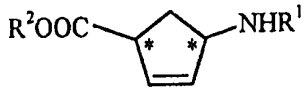
(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

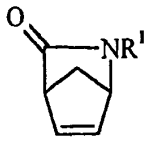
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

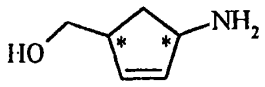
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING (1R,4S)-2-AZABICYLCO[2.2.1]HEPT-5-EN-3-ON DERIVATIVES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (1R,4S)-2-AZABICYCLO[2.2.1]HEPT-5-EN-3-ON-DERIVATEN


(I)


(II)


(III)


(V)

(57) Abstract

The invention relates to a biotechnological method for producing compounds of general formulas (I) and (II), wherein R^1 represents acyl or acyloxy, and R^2 represents a hydrogen atom or C_1–C_{10} alkyl, comprising the reaction of a lactam of general formula (III) using a hydrolase in the presence of a nucleophile and in the presence of a base in a constant pH range. The invention also relates to the subsequent conversion of the compound of general formula (I) into the optically active 1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopentene of formula (V).

(57) **Zusammenfassung**

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln (I), (II), worin R^1 Acyl oder Acyloxy und R^2 ein Wasserstoffatom oder C_{1-10}-Alkyl bedeutet, umfassend die Umsetzung eines Lactams der allgemeinen Formel (III) mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich. Des Weiteren wird die Weiterumsetzung der Verbindung der allgemeinen Formel (I) in das optisch aktive 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten der Formel (V) beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

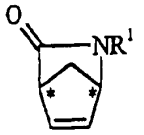
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Herstellung von (1R,4S)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on-Derivaten

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formeln

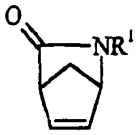


I



II

ausgehend von einem Lactam der allgemeinen Formel



III

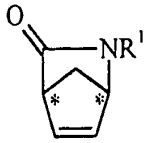
Verbindungen der Formel I wie bspw. (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, welches wiederum ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von carbocyclischen Nukleosiden wie z. B. Carbovir (Campbell et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 4602-4616) ist. Verbindungen der Formel II wie bspw. der (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäurepropylester sind ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von (1S,4R)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, welches ebenfalls ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von carbocyclischen Nukleosiden sein kann.

Bekannt ist lediglich die chemische Herstellung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on durch Acylierung von (1R,4S)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Katagiri et al., Tetrahedron Letters, 1997, 38, 1961). Gemäss dieses Verfahrens kann (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on nur vom entsprechenden (1R,4S)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on als Edukt erhalten werden. Dieses Edukt ist zu kostspielig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I und II bereitzustellen, welche aus leicht erhältlichem, billigem, Ausgangsmaterial in guter Enantiomerenreinheit hergestellt werden können.

Diese Aufgabe wird mit dem neuen biotechnologischen Verfahren gemäss Anspruch 1 gelöst.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln

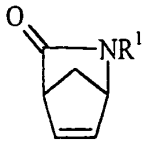


I



II

worin R^1 Acyl oder Acyloxy und R^2 ein Wasserstoffatom oder C_{1-10}-Alkyl bedeutet, erfolgt mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich ausgehend von einem racemischem Lactam der Formel



III

Das Ausgangsmaterial, das Lactam der allgemeinen Formel III (Substrat) kann beispielsweise gemäss Taylor et al., (Tet. Asymmetry. 4, 1993, 1117) hergestellt werden.

C_{1-10}-Alkyl ist linear oder verzweigt sowie substituiert oder unsubstituiert.
Beispiele für C_{1-10}-Alkyl sind Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Isobutyl, tert. Butyl, Isopropyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl und seine Isomere sowie Chlormethyl, Brommethyl, Dichlormethyl, Dibrommethyl, Chlorpropyl, Brombutyl.

Acyl bedeutet Alkanoyl oder Arylcarbonyl. Alkanoyl ist zweckmässig C_{1-4}-Alkanoyl, das substituiert oder unsubstituiert sein kann. Unter substituiertem C_{1-4}-Alkanoyl wird im folgenden mit einem oder mehreren Halogenatomen substituiertes verstanden. Beispiele für C_{1-4}-Alkanoyl sind Acetyl, Propionyl, Butyryl, Chloracetyl, Bromacetyl, Dichloracetyl.
Arylcarbonyl ist zweckmässig Benzylcarbonyl oder Phenylcarbonyl, substituiert oder unsubstituiert.
Acyloxy bedeutet Alkoxycarbonyl oder Aryloxycarbonyl. Alkoxycarbonyl ist zweckmässig C_{1-4}-Alkoxycarbonyl wie Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Propoxycarbonyl, Butoxycarbonyl oder tert-Butoxycarbonyl (BOC). Arlyoxycarbonyl ist zweckmässig Benzyloxycarbonyl oder Phenyloxycarbonyl.
Vorzugsweise bedeutet R^1 C_{1-4}-Alkanoyl oder C_{1-4}-Alkoxycarbonyl insbesondere Acetyl oder Ethoxycarbonyl.

Als Hydrolasen können Proteasen oder Lipasen, vorzugsweise Proteasen wie Serinproteasen eingesetzt werden. Als Serinproteasen können bspw. Chymotrypsine, Trypsine und Subtilisine (bakterielle Serinproteasen) eingesetzt werden. Als Subtilisine können käufliche Subtilisine wie Subtilisin A, Subtilisin B, Alcalasen, ALK-Enzyme, Bacillopeptidase A, Bacillopeptidase B, Bioprasen, Colistinasen, Esperasen, Genenase I, Kazusase, Maxacal, Maxatasen, Nagarsen, Peptidasen, Protease S, Protease VIII, Protease XXVII, Proteinasen, wie die alkaline Proteinase von Bacillus subtilis oder Aspergillus oryzae, Proteinase K von Tritirachium albumin, Savinasen, Subtilopeptidasen, Superasen, Thermoasen verwendet werden. Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Savinasen durchgeführt. Als Savinasen sind Savinase 12 Type W™, Savinase 16.0L Type - EX™, Savinase 32.0L Type - EX™, Savinase 4.0T Type W™ und Savinase 8.0L™ geeignet. Als Lipase kann bspw. Lipase aus Candida antarctica verwendet werden.

Werden als Hydrolasen Proteasen, wie Savinasen, Proteasen von Bacillus subtilis, Proteasen von Aspergillus oryzae, Proteinase K von Tritirachium albumin eingesetzt, wird zweckmässig im racemischem Lactam der Formel III das (1S,4R)-Enantiomere in die entsprechende Verbindung der allgemeinen Formel II hydrolysiert wobei das (1R,4S)-Enantiomere der allgemeinen Formel I anfällt. Werden als Hydrolasen Lipasen wie Lipase von Candida antarctica eingesetzt, wird zweckmässig im racemischen Lactam der Formel III das (1R,4S)-Enantiomere in die entsprechende Verbindung der allgemeinen Formel II hydrolysiert wobei das (1S,4R)-Enantiomere der allgemeinen Formel I anfällt.

Als Nucleophil können Hydroxidionen, Wasser oder C_{1-10}-Alkohole eingesetzt werden. Als C_{1-10}-Alkohole sind geeignet Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, tert-Butanol, Isobutanol, Pentanol, Hexanol, Heptanol, Oktanol, Nonanol oder das Decanol. Wird als Nucleophil ein C_{1-10}-Alkohol eingesetzt, wird wie fachmännisch bekannt der entsprechende Ester der allgemeinen Formel II (R^2=C_{1-10}-Alkyl) gebildet. Wird als Nucleophil Wasser eingesetzt, wird selbstverständlich die entsprechende Säure der allgemeinen Formel II (R^2=H) gebildet.

Abhängig von der Hydrolase und dem Substrat (Lactam der Formel III) wird die Biotransformation zweckmässig zwischen pH 5 und 12, vorzugsweise zwischen pH 6 und 8, durchgeführt. Erfindungsgemäss wird dabei bei einer gegebenen Hydrolase und einem gegebenen Substrat der pH-Wert in Gegenwart einer Base konstant gehalten. Zweckmässig wird der pH-Wert durch Zugabe einer Base um +/- 0,5 pH-Einheiten konstant gehalten. Wird z.B. als Substrat racemisches 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R^1 =

Acetyl) und als Hydrolase Savinase eingesetzt, wird der pH-Wert vorzugsweise zwischen pH 7,0 und pH 7,5 konstant gehalten.
Als Base kann eine anorganische oder organische Base eingesetzt werden. Als anorganische Basen sind z. B. KOH, NaOH, geeignet. Als organische Base kann beispielsweise Triethanolamin gelöst in einem organischen Lösungsmittel geeignet sein.
Wird als Nucleophil einer der oben beschriebenen Alkohole verwendet, kann als Base das entsprechende Alkoholation dienen.

Die Reaktionstemperatur kann in einem Bereich von 10 bis 60 °C, vorzugsweise von 15 bis 40 °C, liegen.

Zweckmässig wird die Biotransformation in Wasser, einer Pufferlösung, einem C_{1-10}-Alkohol oder in einem Gemisch von diesen mit einem aprotischen organischen Lösungsmittel durchgeführt. Als aprotische organische Lösungsmittel sind bspw. Ether, aromatische Kohlenswasserstoffe geeignet. Als Ether können Tetrahydrofuran, Dioxan oder tert-Methyl-butyl-ether verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe sind Toluol und Benzol geeignet. Als Pufferlösungen können z. B. niedermolare wie 10-100mM Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer, Hepes-Puffer verwendet werden. Als C_{1-10}-Alkohole können die zuvor beschriebenen eingesetzt werden.

Die Biotransformation kann auch derart durchgeführt werden, dass das Lactam der allgemeinen Formel III als Lösungsmittel dient. Dann wird zweckmässig die Biotransformation in Gegenwart der Hälfte der stöchiometrischen Mengen an Wasser oder des entsprechenden Alkohols durchgeführt.

Je nach Lösungsmittel kann die Biotransformation in einem Zweiphasen- oder Einphasensystem durchgeführt werden. Zweckmässig wird die Biotransformation in einem Einphasensystem durchgeführt.

Nach einer üblichen Umsetzungszeit von wenigen Stunden werden dann abhängig von dem gewählten Ausgangsmaterial die gewünschten optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II in hervorragender Ausbeute und Enantiomerenreinheit erhalten. Die bevorzugten Ausgangsmaterialien sind racemisches 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R^1=Acetyl) und racemisches 2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1.]hept-5-en-3-on. Die bevorzugten Produkte der Verbindungen der allgemeinen Formel I sind (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R^1 = Acetyl) und (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R^1 = Ethoxycarbonyl). Die bevorzugten Verbindungen der allgemeinen Formel II sind (1S,4R)-1-

Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäure (R^1 = Acetyl, R^2 = H), (1S,4R)-1-Ethoxycarbonyl-2-cyclopenten-4-carbonsäure (R^1 = Ethoxycarbonyl, R^2 = H), (1S,4R)-1-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäuremethylester (R^1 = Acetyl, R^2 = CH_3), (1S,4R)-1-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäurebutylester (R^1 = Acetyl, R^2 = C_4H_9), (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäureethylester (R^1 = Acetyl, R^2 = C_2H_5) und (1S,4R)-1-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäurepropylester (R^1 = Acetyl, R^2 = C_3H_7).
Die (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäure-C_{2-10}-alkylester, ausgenommen der (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäureethylester, vorzugsweise der (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäureethylester und der (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäurepropylester der allgemeinen Formel II sind in der Literatur noch nicht beschrieben und demzufoge ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Ein weiterer Bestandteil der Erfindung ist die Weiterumsetzung, die Reduktion der Verbindung der allgemeinen Formel I, zu einem optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivat, insbesondere zu einem (1R, 4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivat der allgemeinen Formel



IV

worin R^1 die genannte Bedeutung hat.

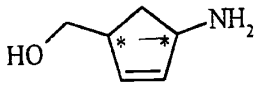
Zweckmässig wird die Reduktion mit binären oder komplexen Metallhydriden der Bor- oder Aluminiumgruppe durchgeführt wie mit Alkalimetall-, Erdalkalimetallborhydriden, Alkalimetall-, Erdalkalimetallaluminiumhydriden.
Als binäre Alkalimetall- oder Erdalkalimetallborhydride können $NaBH_4$, $LiBH_4$, KBH_4, $NaAlH_4$, $LiAlH_4$, $KAlH_4$, $Mg(BH_4)_2$, $Ca(BH_4)_2$, $Mg(AlH_4)_2$, $Ca(AlH_4)_2$ verwendet werden. Komplexe Metallhydride der Bor- oder Aluminiumgruppe können die allgemeine Formel M^1 M^2 H_nL_m haben, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 4 ist und m eine ganze Zahl von 4 bis 4 minus der entsprechenden Zahl n ist, M^1 ein Alkalimetallatom, M^2 Bor oder Aluminim bedeutet und L C_{1-4}-Alkyl, C_{1-4}-Alkenyl, C_{1-4}-Alkoxy, CN oder ein Amin ist, oder die komplexen Metallhydride können die allgemeine Formel $M^2H_OL_p$ haben, worin M^2 die genannte Bedeutung hat und O eine ganze Zahl von 0 bis 3 ist und p eine ganze Zahl von 3 bis 3 minus der entsprechenden Zahl p ist. Als M^1 M^2 H_nL_m können LiBH $(C_2H_5)_3$, $LiBH_x(OCH_3)_{4-1}$, worin x eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet, $LiAlH(OC(CH_3)_3)_3$, $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$, $NaAlH_2(C_2H_5)_2$ oder $NaBH_3CN$ eingesetzt werden. Vorzugsweise wird die Reduktion mit einem Metallborhydrid wie Natriumborhydrid durchgeführt.

Zweckmässig werden die Metallhydride in einem molaren Verhältnis von 0,5 bis 1 pro mol der Verbindung der allgemeinen Formel I eingesetzt.

Zweckmässig wird die Reduktion unter Inertgasatmosphäre wie beispielsweise unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Die Reduktion kann bei einer Temperatur von -10 bis 30 °C, vorzugsweise bei einer Temperatur von 0 bis 10°C, durchgeführt werden.
Als Lösungsmittel sind für die Reduktion sekundäre oder tertiäre Alkohole geeignet. Als sekundärer Alkohol kann bspw. 2-Butanol und als tertiärer Alkohol kann bspw. tert. Amylalkohol eingesetzt werden. Vorzugsweise wird ein sekundärer Alkohol eingesetzt.

Die Weiterumsetzung, die Hydrolyse der optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivate der Formel IV zu den entsprechenden optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclcopentenen bzw. deren Salze, der Formel



V

mit einem Erdalkali-, Alkalimetallhydroxid oder mit einer Mineralsäure ist ebenfalls Bestandteil der Erfindung. Insbesondere wird das (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivat zum (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten hydrolysiert.

Als Alkalimetallhydroxid ist Lithium-, Natrium- oder Kaliumhydroxid geeignet. Als Erdalkalimetallhydroxid kann bspw. Bariumhydroxid eingesetzt werden. Als Mineralsäuren sind Halogenwasserstoffsäuren wie bspw. Salzsäure oder Bromwasserstoffsäure geeignet.

Zweckmässig wird die Hydrolyse bei einer Temperatur von 50 bis 120 °C, vorzugsweise von 90 bis 100°C, durchgeführt.

Als Salze des (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopentens (Formel V) sind dessen Hydrohalogenidsalze wie Hydrochloride oder Hydrobromide geeignet.

Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten ausgehend von racemischem (±)-2-Acetyl-2-azabicylco[2.2.1]hept-5-en-3-on

1.1 Herstellung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

1.1.1 mittels Savinase in einem Gemisch von Natriumphosphat-Puffer und Tetrahydrofuran

5 ml Tetrahydrofuran wurden mit 3,84 ml 20 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7 und 1,16 ml Savinase 16.0 L Type EX, Novo Nordisk (16 KNPU/g, Kilo Novo Protease Units) gemischt. Zu dem Ansatz wurden 417 µl, (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (330 mmol/l) gegeben. Die Reaktion wurde mit einem Magnetrührer gemischt und mittels eines Wasserbades bei 30°C gehalten. Der pH-Wert wurde durch eine pH-Regelung mit 1M NaOH konstant bei pH 7 gehalten. Proben wurden periodisch entnommen und mit HPLC auf Gehalt und Enantiomerenüberschuss analysiert (Chriralpak AD, Daicel Chemical Ltd. (0,46 x 25 cm), isokratisch bei Raumtemperatur, Fluss 1 ml/min mit n-Heptan (Ethanol 2%, Detektion bei 215 nm)). Insgesamt wurden dabei 1,25 ml NaOH verbraucht. Nach 120 Minuten war 50% der eingesetzten Menge an (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on zur entsprechenden Säure hydrolysiert. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mit achiraler GC. Die Analytik wurde mit Gaschromatographie wie folgt durchgeführt: Kapillar-Säule: HP -5 (5% Phenylmethylsiloxan), Temperaturgradient 100 °C – 260 °C, die Proben wurden für die Analyse in Tetrahydrofuran 1:1 verdünnt.

1.1.2 in Wasser

1.1.2.1 Zu 419,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden 60 ml H_2O und 35 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 gegeben. Der pH-Wert wurde mit 7.5 N NaOH auf 7,5 gehalten, der 1l-Applikon Fermenter wurde mit 400 Upm gerührt. Gemäss Beispiel 1.1.1 wurden Proben periodisch entnommen und analysiert. Nach 45 h wurde ein ee-Wert von 99% gemessen.

Der Ansatz wurde über ein Whatman GF/F Filter abgenutscht und der Filterkuchen wurde 2 mal mit 100 ml und 1 mal mit 50 ml Butylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit 200 ml Butylacetat

ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotavap eingeengt. 144,8 g Produkt mit einem ee-Wert von > 98% wurden erhalten, was einer Ausbeute von 31% bez. des Racemats entsprach. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

1.1.2.2 Zu 486,3 g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden 60 ml H_2O und 35 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 gegeben. Der pH-Wert wurde mit 7,5 N NaOH auf 7,5 gehalten, der 1l-Applikon Fermenter wurde mit 400 Upm gerührt. Gemäss Beispiel 1.1.1 wurden Proben periodisch entnommen und analysiert. Nach 45 h wurde ein ee-Wert von >98% gemessen. Insgesamt wurden 174,6 ml 7,5 N NaOH verbraucht.
Der Ansatz wurde über ein Whatman GF/F Filter abgenutscht und der Filterkuchen wurde 2 mal mit 100 ml und 1 mal mit 50 ml Butylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit 200 ml Butylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotavap eingeengt. 144,8 g Produkt mit einem ee-Wert von > 98% (Gehalt: 92,5%) wurden erhalten, was einer Ausbeute von 29% bez. des Racemats entsprach. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

1.1.3 in Methanol

72,3 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt 95,4%) wurden mit 8,3 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 und 19,4 ml Methanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von 24 h bei 30°C gerührt. Der pH blieb dabei konstant bei 7,2. Proben wurden nach Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 25 h wurde ein ee-Wert von > 98% erreicht und die Reaktion wurde beendet. Die analytische Ausbeute betrug 42% bez. des Racemats. Dabei bildete sich in stöchiometrischen Mengen der entsprechende Methylester ($R^2 = CH_3$) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was mit GC-MS bewiesen wurde. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

1.1.4 in Butanol

72,3 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt 95,4%) wurden mit 76,86 ml 1-Butanol und 8,3 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von 22 h gemessen. Nach dieser Zeit wurde ein ee-Wert von > 98% mit HPLC

bestimmt. Der pH-Wert wurde mit 4 N NaOH bei pH 7,5 konstant gehalten. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Die Reaktionstemperatur lag bei 30°C. Es bildete sich freie Säure (R^2 = H) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was anhand von HPLC bewiesen wurde und der Butylester (R^2 = C_4H_9) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was anhand von GC-MS bewiesen wurde. Eine analytische Ausbeute von 34,8% bez. des Racemats wurde erreicht.

1.1.5 mittels Savinase in 1-Propanol

1.1.5.1 242g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on, 168,6 ml 1-Propanol und 28 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 wurden bei 30°C und bei einem pH von 7,0 (eingestellt mit 4 N NaOH) inkubiert. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 24 h wurde der ee-Wert des Produktes zu % ee = 99% ermittelt. Die analytische Ausbeute betrug 47%. Anschliessend wurden zu dieser Mischung (459 ml) 100 ml Toluol hinzugegeben und das Propanol unter reduziertem Druck abgedampft. Dann wurde die Lösung zweimal mit Toluol (250 ml) und Wasser (100 ml) extrahiert. Toluol wurde abgedampft und das Produkt destilliert. Es wurden 113,9 g (0,69 mol) Produkt (Reinheit 93%, ee = 99%) entsprechend einer Ausbeute von 45,7% bez. des Racemats erhalten. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

1.1.5.2 208g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%), 168,6 ml 1-Propanol und 23 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 wurden bei 30°C und bei einem pH von 7,2 (eingestellt mit 4 N NaOH) im Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach 30 h wurde der ee-Wert des Produktes zu % ee = > 98% ermittelt. Anschliessend wurden zu dieser Mischung (459 ml) 100 ml Toluol hinzugegeben und das Propanol unter reduziertem Druck abgedampft. Dann wurde die Lösung zweimal mit Toluol (250 ml) und Wasser (100 ml) extrahiert. Toluol wurde abgedampft und das Produkt destilliert (12 mbar, 85 - 95°C). Es wurden 79,13 g (0,69 mol) Produkt (Reinheit 93%, ee > 98%) entsprechend einer Ausbeute von 37% bez. des Racemats erhalten. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

1.1.5.3 2,77 kg (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt 95,8%), 1,35l 1-Propanol und 355,5 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1. wurden bei 40°C und einem pH-Wert = 7,4 (eingestellt durch Zugabe

von 92g 4N NaOH) in einem 5 l Rührreaktor umgesetzt. Hierbei wurde der pH-Wert durch Zugabe von 4N NaOH bei pH = 7,4 konstant gehalten. Nach 14 h wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 20%iger Schwefelsäure auf pH = 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 1,15 l Toluol wurden die Phasen getrennt und die organische Phase im Vakuum destilliert (Produktfraktion bei T=72-76°C, p=1 mbar). Es wurden 1,07 kg Produkt (Gehalt 91%, ee = 98,4%) entsprechend einer Ausbeute von 36,5% erhalten. Der Gehalt des Produkts wurde mittels GC auf einer Optima5-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt. Der ee des Produkts wurde mittels GC auf einer chiralen LipodexE-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt.

1.1.5.4 **Isolation von (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäurepropylester**

345 g des Blasenrests aus Beispiel 1.1.5.3 wurden mit 250 ml Esssigsäureethylester und 1 l Hexan versetzt und das Gemisch wurde auf Rückflusss erhitzt. Es bildeten sich zwei Phasen, die obere Phase wurde abgetrennt und langsam auf 0°C abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und bei 40°C im Vakuum getrocknet. Es wurden 85,6 g farbloses Produkt erhalten.
Der ee-Wert wurde mittels GC auf einer chiralen Hydrodex-β-PM-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt, ee = 93%.
$\alpha_{D,20°C}$(c=1, MeOH)= 79,3°
^{1}H-NMR($CDCl_3$): 5,91 (br,1H)
5,89 (s, 2H)
5,07 (m, 1H)
4.07 (t, 2H)
3,50 (m, 1H)
2,46 (m, 1H)
1,96 (s, 3H)
1,90 (m, 1H)
1,67 (m 2H)
0,96 (t, 3H)

1.1.6 **mittels Protease von Bacillus subtilis in Phosphat-Puffer**

1.1.6.1 25 mg Bacillus subtilis Protease (Fluka 82490), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 6 h war alles (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. 1,5 h nach Inkubation war der Enantiomerenüberschuss von (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on >98%. Die nicht isolierte Ausbeute betrug 12% bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

1.1.6.2 125 mg Bacillus subtilis Protease (Fluka 82490), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 6 h war 90% des (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. 1,5 h nach der Inkubation war der Enantiomerenüberschuss von (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on >98%. Die nicht isolierte Ausbeute betrug dann 12% bez. des Racemats.

1.1.7 **mittels Protease von Aspergillus oryzae in Phosphat-Puffer**

1.1.7.1 25 mg Aspergillus oryzae (Sigma P-4032, 3.5 Units/mg), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war > 40% bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1.1.1 beschrieben bestimmt.

1.1.7.2 125 mg Aspergillus oryzae (Sigma P-4032, 3.5 Units/mg), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-)

2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war > 40% bez. des Racemats.

1.1.8 mittels Proteinase K von Tritirachium albumin in Phosphat-Puffer

1.1.8.1 25 mg Proteinase K (Sigma P-8044 1 – 7 Units/mg), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 40 % bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt..

1.1.8.2 125 mg Proteinase K (Sigma P-8044 1 – 7 Units/mg), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 30 % bez. des Racemats.

1.2 Herstellung von (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (mittels Lipase von Candida antarctica)

1.2.1 25 mg SP525 (Novo Nordisk), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0.05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden

bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 12%. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

1.2.2 250 mg SP525 (Novo Nordisk), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 2,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 16 h war alles (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (+) (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 12% bez. des Racemats.

1.3. Reduktion von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicylo[2.2.1] hept-5-en-3-on zu (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten

1.3.1 Zu einer Lösung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicylo[2.2.1] hept-5-en-3-on (50 g, 0,33 mol), 40 ml Wasser, 240 ml 2-Butanol wurden portionsweise 8 g $NaBH_4$ zugegeben und die Temperatur unter 5°C gehalten. Nach 1 h wurde die Reaktion gestoppt und dann die Reaktionsmischung mit HCl konz. auf pH 2,0 eingestellt. Die Reaktionstemperatur wurde unter 10°C gehalten. Der pH-Wert wurde mit 30%-iger NaOH auf pH 9,0 eingestellt. Natriummetaborat wurde abfiltriert und die Wasserphase wurde dreimal mit 2-Butanol extrahiert. Nach Abdampfen von 2-Butanol wurden 49,3 g Produkt (0,28 mol) entsprechend einer Ausbeute von 88% erhalten.

1.3.2. 287,4 g (-)-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (100 %-ig ⇒ ~ 255 ml, 97%-ig; 1,9 mol) wurden in 380 ml Wasser und 1217 ml 2-Butanol gelöst. Die Lösung wurde auf 0 bis – 2 °C gekühlt.
In einem anderen Rührwerk wurden 45 g $NaBH_4$ (1,188 mol, 1,25 Eq) in 304 ml frisches 2-Butanol suspendiert. Die $NaBH_4$-Suspension wurde innerhalb 1 - 2 Stunden in die Lösung zugegeben. Die Reaktion war exotherm und die Temperatur durfte 5 °C nicht überschreiten. Vor einer Portionzugabe musste die Temperatur bei 0 °C liegen. Die Reaktion wurde mittels DC (Hexan/Etrol/MeOH : 5/5/1) verfolgt. Nach der Zugabe wurde noch 1 bis 2 h nachreagieren gelassen. Der Umsatz wurde kontrolliert. Wenn der Umsatz in Ordnung war, (Konzentration an Edukt sollte < 1,0% sein) wurde mit ca. 135 g konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Die Temperatur wurde unter 10 °C gehalten. Dann wurde sofort mit ca. 85 ml 30%-ige Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Die ausgefallenen Salze wurden filtriert und mit 127 ml frischem 2-Butanol gewaschen. Das Filtrat und das "Wasch-2-Butanol" wurden gesammelt und die Phasen getrennt. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit je 380 ml frischem 2-Butanol extrahiert. Die 2-Butanol-Phasen wurden gesammelt. Man erhielt ca. 2450 g 10%-ige Lösung Produkt, (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten in 2-Butanol. Dies entsprach ca. 250 g 100%-iges Produkt (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, entsprechend einer Ausbeute von 85%.

1.4. Hydrolyse von (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten zu (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten

1.4.1 Zu 49,3 g (0,28 mol) (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten wurde 30%ige NaOH (45 g) zugegeben und die Suspension auf 100°C erwärmt. Nach 3,5 h wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und dann mit konz. HCl auf pH = 1,0 eingestellt. Dann wurde Wasser abgedampft und NaCl abfiltriert. Anschliessend wurde Pentanol (2 ml pro g Rest) und Aceton (6 ml pro g Rest) hinzugegeben und das ausgefallene Präzipitat filtriert und mit 20 ml Aceton gewaschen. Es wurden 37,5 g (0,24 mol) Produkt als Hydrochloridsalz mit einem ee = 99%, entsprechend einer Ausbeute von 86% erhalten.

1.4.2. 85,4 g (-)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten 100 %-ig (0,55 mol) als 10%-ige Lösung in 2-Butanol wurden vorgelegt. Es wurde dann destilliert bis kein Destillat mehr kommt. Anschliessend wurden 110,0 g 30%-ige Natronlauge (⇒ 33,0 g NaOH 100%-ig; 0,825 mol; 1,5 Eq) und 65 g Wasser zugegeben. Das restliche 2-Butanol wurde durch azeotrope Destillation entfernt (mit ca. 10 g Wasser). Dann wurde die Lösung unter Rückfluss (100 – 110 °C) für 4 - 5 h erhitzt. Die Reaktion wurde mittels GC verfolgt. Wenn der Umsatz in Ordnung war, wurde auf 50 °C abgekühlt und 154 ml 2-Butanol (124,3 g) wurden zugegeben. Die Phasen wurden bei 50 °C getrennt und die Wasserphase nochmals mit 154 ml 2-Butanol (124,3 g) bei 50 °C extrahiert (15 Min Rühren, Phasen trennen). Die Wasserphase (ca. 165 g) wurde entsorgt. Die organischen Phasen wurden gesammelt und ca. 22 g Chlorwasserstoff wurden bei 20 – 40 °C bis pH 1 zugegeben. Einige Salze fielen während des Ansäuerns aus. Diese Salze wurden bei 20 °C filtriert und das Filtrat wurde unter Normaldruck destilliert bis 220 ml Destillat (ca. 180 g) aufgefangen waren (Kochtemperatur ca. 91 – 92 °C). Danach wurden bei ca. 70 °C 176 ml Aceton (139,0 g) zugegeben. Die Suspension wurde 15 bis 30 min unter Rückfluss gerührt und dannach auf –5 °C abgekühlt. Nach 1 h bei dieser Temperatur wurde die Suspension abgenutscht und der Filterkuchen mit 154 ml Aceton gewaschen. Man erhielt 70,0 g (-)-Produkt 100%-ig entsprechend einer Ausbeute von 85%.
Gehalt : 99.0% (Tit., wt.%)
NaCl : 0.5 bis 1.0%

Beispiel 2

Herstellung von (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

2.1. Herstellung von racemischem (±)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

109,13 g racemisches 2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden mit 182,1 g Triethylamin, 6,11 g 4-Dimethylaminopyridin und 500 ml Acetonitril gemischt. Die Reaktion wurde auf 50 °C erwärmt. Danach wurde portionenweise 195,3 g Ethylchlorformiat, gelöst in 150 ml Acetonitril, zugegeben. Die Temperatur wurde unter 55 °C gehalten. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf 20 °C gekühlt und die Salze wurden abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde bei 60 °C und 20 mbar eingeengt und anschliessend in 1500 ml Toluol aufgenommen. Darauf folgten 3 Extraktionen: mit 250 ml Wasser, pH 8, mit 250 ml

Essigsäure (1%), mit 250 ml gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet und bei 80 °C/20 mbar eingeengt. 167,4 g eines braunen Öles wurden erhalten. Der Gehalt nach GC war 96 %. (±)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurde gereinigt durch Vakuumdestillation, $b.p_{0.01}$ = 76,5 °C, Gehalt (GC) : 99,5 %, Ausbeute : 156,6 g (88,5 %)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 1,33 (t, 3H);
2,19 (d, 1H);
2,38 (d, 1H);
3,43 (s, 1H);
4,26 (m, 2H);
5,04 (s, 1H);
6,68 (m, 1H);
6,92 (m;1H).

2.2 Herstellung von (-)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

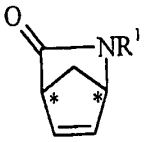
Analog zu Beispiel 2.1. wurde das Produkt ausgehend von (-)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicylclo[2.2.1]hept-5-en-3-on hergestellt.

2.3 Herstellung von (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

500 µl Savinase gemäss Beispiel 1.1.1, 5 ml n-Propanol, 4,5 ml (50 mM Phosphatpuffer pH 8/Tetrahydrofuran, 1/1) und 250 µl (+/-) Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden bei 40 °C bei pH 8 inkubiert. Durch manuelle Zugabe von 1N NaOH wurde der pH Wert auf 8 gehalten. Proben wurden wie in Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 4,5 h wurde ein ee Wert von >98 % für das (-) Enantiomere gemessen, was anhand des hergestellten Standards (Beispiel 2.2) bewiesen wurde. Die nichtisolierte, analytische Ausbeute bezogen auf das Racemat betrug 46%.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formeln

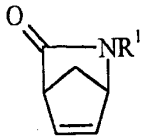


I



II

worin R^1 Acyl oder Acyloxy und R^2 ein Wasserstoffatom oder C_{1-10}-Alkyl bedeutet, worin ein racemisches Lactam der allgemeinen Formel



III

mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Hydrolase eine Protease oder Lipase verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, das man als Protease eine Serinprotease verwendet.

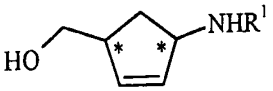
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Serinprotease ein Subtilisin verwendet.

5. Verfahren nach mindesten einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als racemisches Lactam der allgemeinen Formel III 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on oder 2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-3-on einsetzt.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Wasser, einer Pufferlösung, einem C_{1-10}-Alkohol oder in einem Gemisch aus diesen mit einem aprotischen organischen Lösungsmittel durchführt.

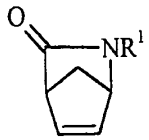
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung bei einer Temperatur von 10 bis 60°C durchführt.

8. Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivaten der allgemeinen Formel



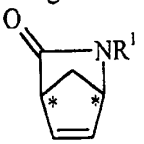
IV

worin R^1 die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lactam der allgemeinen Formel



III

worin R^1 die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich in die Verbindung der allgemeinen Formel



I

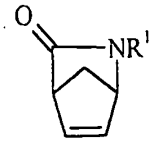
überführt und diese dann zu der Verbindung der allgemeinen Formel IV reduziert.

9. Verfahren zur Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten der Formel



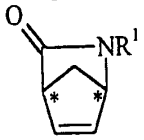
V

bzw. dessen Salze, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lactam der allgemeinen Formel



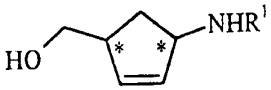
III

worin R^1 die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich in die Verbindung der allgemeinen Formel



I

worin R^1 die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, überführt, diese dann in die Verbindung der allgemeinen Formel



IV

worin R^1 die genannte Bedeutung hat, reduziert und diese dann zu der Verbindung der Formel V hydrolysiert.

10. (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäure-C_{2-10}-alkylester, ausgenommen (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäureethylester.

11. (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäurethyl- oder propylester.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/EP 99/04814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P41/00 C12P17/10 C12P13/00 C12P13/02 C07C233/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CSUK, RENE ET AL: "Biocatalytical transformations. IV. Enantioselective enzymic hydrolyses o building blocks for the synthesis of carbocyclic nucleosides" TETRAHEDRON: ASYMMETRY (1994), 5(2), 269-76 ,1994, XP002063687 the whole document ---	1-11
A	EVANS C T ET AL: "POTENTIAL USE OF CARBOCYCLIC NUCLEOSIDES FOR THE TREATMENT OF AIDS CHEMO-ENZYMATIC SYNTHESES OF THE ENANTIOMERS OF CARBOVIR" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, no. 5, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 589-592, XP002089871 ISSN: 0300-922X the whole document ---	1,8,9

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 November 1999	08/11/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Delanghe, L

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int tional Application No
PCT/EP 99/04814

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate. of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 688 933 A (ROBERTS STANLEY MICAHEL ET AL) 18 November 1997 (1997-11-18) column 3; claims	1,8,9
A	WO 98 10075 A (CHIROSCIENCE LTD) 12 March 1998 (1998-03-12) claims	1
A	BRABBAN A ET AL: "STEREOSPECIFIC GAMMA-LACTAMASE ACTIVITY IN A PSEUDOMONAS FLUORESCENS SPECIES" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, vol. 16, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 8-14, XP002048090 ISSN: 0169-4146 the whole document	1
A	TAYLOR S J C ET AL: "DEVELOPMENT OF THE BIOCATALYTIC RESOLUTION OF 2 -AZABICYCLO 2.2.1HEPT-5-EN-3-ONE AS AN ENTRY TO SINGLE -ENANTIOMERCARBOCYCLIC NUCLEOSIDES" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, vol. 4, no. 6, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 1117-1128, XP002041316 ISSN: 0957-4166 the whole document	1
P,X	WO 99 10519 A (DAWSON MICHAEL JOHN ;WALLIS CHRISTOPHER JOHN (GB); GLAXO GROUP LTD) 4 March 1999 (1999-03-04) the whole document	1-11

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int tional Application No
PCT/EP 99/04814

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5688933 A	18-11-1997	US 5498625 A	12-03-1996
		AT 118208 T	15-02-1995
		DE 69016739 D	23-03-1995
		DE 69016739 T	14-06-1995
		DK 424064 T	26-06-1995
		EP 0424064 A	24-04-1991
		ES 2067693 T	01-04-1995
		GR 3015887 T	31-07-1995
		JP 2648013 B	27-08-1997
		JP 3218380 A	25-09-1991
		US 5284769 A	08-02-1996
WO 9810075 A	12-03-1998	AU 4123897 A	26-03-1998
		EP 0925361 A	30-06-1999
		ZA 9707912 A	03-09-1998
WO 9910519 A	04-03-1999	AU 9738698 A	16-03-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04814

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P41/00 C12P17/10 C12P13/00 C12P13/02 C07C233/52

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CSUK, RENE ET AL: "Biocatalytical transformations. IV. Enantioselective enzymic hydrolyses o building blocks for the synthesis of carbocyclic nucleosides" TETRAHEDRON: ASYMMETRY (1994), 5(2), 269-76 ,1994, XP002063687 das ganze Dokument ---	1-11
A	EVANS C T ET AL: "POTENTIAL USE OF CARBOCYCLIC NUCLEOSIDES FOR THE TREATMENT OF AIDS CHEMO-ENZYMATIC SYNTHESES OF THE ENANTIOMERS OF CARBOVIR" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, Nr. 5, 1. Januar 1992 (1992-01-01), Seiten 589-592, XP002089871 ISSN: 0300-922X das ganze Dokument ---	1,8,9

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. November 1999	08/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Delanghe, L

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int tionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04814

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 688 933 A (ROBERTS STANLEY MICAHEL ET AL) 18. November 1997 (1997-11-18) Spalte 3; Ansprüche	1,8,9
A	WO 98 10075 A (CHIROSCIENCE LTD) 12. März 1998 (1998-03-12) Ansprüche	1
A	BRABBAN A ET AL: "STEREOSPECIFIC GAMMA-LACTAMASE ACTIVITY IN A PSEUDOMONAS FLUORESCENS SPECIES" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Bd. 16, Nr. 1, 1. Januar 1996 (1996-01-01), Seiten 8-14, XP002048090 ISSN: 0169-4146 das ganze Dokument	1
A	TAYLOR S J C ET AL: "DEVELOPMENT OF THE BIOCATALYTIC RESOLUTION OF 2 -AZABICYCLO 2.2.1HEPT-5-EN-3-ONE AS AN ENTRY TO SINGLE -ENANTIOMERCARBOCYCLIC NUCLEOSIDES" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, Bd. 4, Nr. 6, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 1117-1128, XP002041316 ISSN: 0957-4166 das ganze Dokument	1
P,X	WO 99 10519 A (DAWSON MICHAEL JOHN ;WALLIS CHRISTOPHER JOHN (GB); GLAXO GROUP LTD) 4. März 1999 (1999-03-04) das ganze Dokument	1-11

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04814

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5688933 A	18-11-1997	US 5498625 A	12-03-1996
		AT 118208 T	15-02-1995
		DE 69016739 D	23-03-1995
		DE 69016739 T	14-06-1995
		DK 424064 T	26-06-1995
		EP 0424064 A	24-04-1991
		ES 2067693 T	01-04-1995
		GR 3015887 T	31-07-1995
		JP 2648013 B	27-08-1997
		JP 3218380 A	25-09-1991
		US 5284769 A	08-02-1996
WO 9810075 A	12-03-1998	AU 4123897 A	26-03-1998
		EP 0925361 A	30-06-1999
		ZA 9707912 A	03-09-1998
WO 9910519 A	04-03-1999	AU 9738698 A	16-03-1999